

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE *NESTED* PCR PARA A
DETECÇÃO DE DNA DE MEMBROS DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS**

Cristina Pires de Araújo

Campo Grande, MS
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE *NESTED* PCR PARA A
DETECÇÃO DE DNA DE MEMBROS DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS**

Development of a nested PCR to detect DNA of members of the
Mycobacterium tuberculosis complex in tissues of cattle and buffaloes

Cristina Pires de Araújo

Orientador: Prof. Dr. **Flávio Ribeiro de Araújo**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Campo Grande, MS 2014

Certificado de aprovação

CRISTINA PIRES DE ARAUJO

Desenvolvimento de nested PCR para a detecção de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos

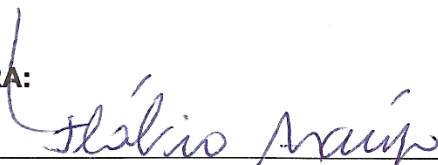
Development of a nested PCR to detect DNA of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in tissues of cattle and buffaloes

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA:



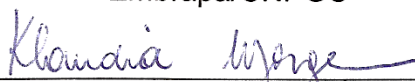
Doutor Flávio Ribeiro de Araújo
(Embrapa) - (Orientador)



Doutor Walter Lilenbaum
UFF



Doutor Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Embrapa/CNPGC



Doutora Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge
UFMS



Doutora Ana Luiza Alves Rosa Osório
UFMS

Para minha linda família bípede e quadrúpede

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo.

À Profa.Dra. Ana Luíza Alves Rosa Osório.

Ao Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos.

À Dra. Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge.

Ao Antonio Francisco de Souza Filho.

Às “irmãs” de laboratório (Elaine, Ana Beatriz, Ingrid e Letícia).

A todos os colegas e funcionários da Embrapa Gado de Corte.

À Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal - IAGRO.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Acredite que você pode, assim você já está no meio do caminho.
Theodore Roosevelt

Resumo

ARAÚJO, C.P. Desenvolvimento de *nested* PCR para a detecção de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos. 2014. 58f. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

A tuberculose bovina causada por *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), é uma enfermidade crônica que acomete, além dos bovinos e bubalinos, também animais silvestres e o homem. A enfermidade é endêmica no Brasil, e seu controle se tornou alvo de exigências sanitárias internacionais. Atualmente vários sistemas de diagnóstico molecular, especialmente aqueles baseados na tecnologia de PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos por serem mais rápidos e apresentarem maiores possibilidades de automação. Técnicas de PCR em tempo real aplicadas diretamente a tecidos ainda são pouco exploradas e na maioria dos casos as reações carecem de validação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver duas *nested* PCR a partir de PCR convencional seguida de PCR em tempo real para identificar bactérias do CMT e *M. bovis* em tecidos de bovinos e bubalinos. No primeiro estudo, a *nested* PCR baseada no alvo *rv2807* apresentou 100% de especificidade analítica para CMT quando testada com DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas estreitamente relacionadas com Actinomycetales. A sensibilidade clínica da *nested* PCR foi de 76,7% detectada com tecidos de amostras positivas para CMT (confirmadas por PCR convencional de colônias). Evidenciou-se especificidade clínica de 100% com DNA de amostras de tecidos de bovinos, com resultados negativos no teste cervical comparativo (TCC). No segundo estudo uma *nested* PCR tendo como alvo a região *TbD1* alcançou sensibilidade clínica de 76,0% em amostras de tecido de animais que apresentavam resultados positivos em TCC, assim como daqueles com lesões compatíveis com tuberculose (LCT), que apresentaram culturas positivas. Detectou-se especificidade clínica de 100% em amostras de tecido de animais com resultados negativos no TCC, sem lesões visíveis (SLV) e com cultura negativa. Não foram encontradas diferenças significativas entre *nested* PCR e cultura para detectar animais positivos ao TCC com LCT ou SLV. A utilização dos ensaios de *nested* PCR para detectar CMT e *M. bovis* em homogeneizados de tecidos permitiu rápido diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina.

Palavras-chave: tuberculose bovina; *nested* PCR; *M. bovis*

Abstract

ARAÚJO, C.P. Development of a nested PCR to detect DNA of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in tissues of cattle and buffaloes. 2014. 58f. Doctoral dissertation – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, 2014.

Bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), is a chronic disease that affects not only cattle and buffaloes, but also humans and wild animals. The disease is endemic to Brazil, but its control has become the focus of international sanitary requirements. Several molecular diagnostic systems have been developed, particularly those based on real-time PCR, given their faster results and higher potential for automation. However, real-time PCR techniques performed directly from tissues remain largely unexplored, and in most cases have not been validated. The purpose of this investigation was to develop nested PCR approaches using conventional PCR followed by real-time PCR to identify MTC bacteria and *M. bovis* in cattle and buffalo tissues. In a first study, nested PCR based on target *rv2807* exhibited 100% analytical specificity for MTC when tested with DNA from reference strains of non-tuberculous mycobacteria closely related to Actinomycetales. Clinical sensitivity was 76.7% for tissue samples positive for MTC (as validated by conventional colony PCR). Clinical specificity of 100% was observed for DNA from cattle tissue samples negative on comparative cervical intradermal tuberculin test (CITT). In a second study, nested PCR using target *TbD1* achieved 76.0% clinical sensitivity on tissue samples from CITT positive animals, as well as from culture positive animals with tuberculosis compatible lesions (TCLs). Clinical specificity of 100% was found for tissue samples from CITT negative, culture-negative animals with non-visible lesions (NVLs). No significant differences between nested PCR and culture were found in the detection of CITT positive animals with TCLs or NVLs. The use of nested PCR to detect MTC organisms and *M. bovis* in tissue homogenates ensured rapid diagnosis of bovine and buffalo tuberculosis.

Keywords: bovine tuberculosis; nested PCR; *M. bovis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	11
3 OBJETIVOS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
ARTIGO 1 DETECÇÃO DIRETA DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS POR <i>NESTED</i> PCR.....	18
ARTIGO 2 DETECÇÃO DIRETA DE <i>Mycobacterium bovis</i> EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS COM <i>NESTED</i> PCR PARA TbD1.....	38

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa crônica, causada por *Mycobacterium bovis*, que afeta além dos bovinos, bubalinos, animais domésticos e algumas espécies de silvestres. A transmissão para os seres humanos constitui um problema de saúde pública (MEDEIROS et al., 2010; STEWART et al., 2013).

As espécies causadoras da tuberculose em mamíferos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), um grupo de micobactérias intimamente relacionadas, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii* (BROSCH et al., 2002), *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003), *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003), *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010), *Mycobacterium orygis* (VAN INGEN et al., 2012).

A doença causa danos substanciais para o setor pecuário e ocorre principalmente em países em desenvolvimento (COSTA et al., 2013). Nestes países a sua prevalência é maior e o conhecimento do problema é limitado.

Atualmente com o controle mundial da febre aftosa acredita-se que a tuberculose e a brucelose bovina sejam as próximas doenças a serem consideradas barreiras sanitárias internacionais. Este fato é comprovado pela restrição imposta pela União Aduaneira onde propriedades com animais positivos não podem ser comercializados para este mercado (BRASIL, 2012).

O programa de controle e erradicação da tuberculose bovina e bubalina implantado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) teve início em 2001 e estudos sobre a prevalência atual de tuberculose bovina estão sendo executados (BRASIL, 2006).

Uma das dificuldades encontradas nos programas de controle é o longo tempo para o diagnóstico definitivo para tuberculose. Lesões encontradas em frigoríficos demandam diagnóstico rápido, o que não é possível com o método atualmente preconizado pelo MAPA (cultura). A disponibilidade de testes confirmatórios que permitam detectar rapidamente a presença de micobactérias tuberculosas em tecidos de animais suspeitos seria uma grande vantagem para melhorar a eficiência dos programas de erradicação da tuberculose bovina e assim diminuir os custos econômicos associados (COSTA et al., 2013).

Abordagens moleculares como PCR e PCR tempo real são mais rápidas e confiáveis e assim permitem maior agilidade na tomada de decisões. Tais técnicas

apresentam melhorias na especificidade, sensibilidade, limite de detecção e redução no tempo de diagnóstico quando comparado com a cultura (FURLANETTO et al., 2012). Embora muitos sistemas de PCR e PCR tempo real já tenham sido descritas para detectar tuberculose de amostras biológicas humanas, o diagnóstico direto de tecidos animais ainda é pouco explorado (COSTA et al., 2013).

Vários pesquisadores que, utilizaram homogeneizados de tecido, aplicaram em sua maioria iniciadores para a região IS6110 (*insertion sequence*) que embora presente em várias cópias no genoma de bactérias do CMT também está presente em micobactérias ambientais (COROS et al., 2008; COSTA et al., 2013) o que pode confundir o diagnóstico correto. Face a estes estudos, sobre a identificação direta do agente da tuberculose em tecidos, percebe-se que existe demanda por testes que explorem novos genes alvo e possam diagnosticar amostras paucibacilares.

Genes como *rv2807*, presente em bactérias do CMT, a região TbD1, presente em *Mycobacterium bovis* e cepas ancestrais de *Mycobacterium tuberculosis*, podem ser promissores quando aplicados em técnicas de *nested* PCR se comparados com métodos tradicionais utilizados no diagnóstico da tuberculose bovina e podem proporcionar ainda uma redução significativa no tempo de confirmação da presença do agente em homogeneizados de tecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares para diagnóstico de tuberculose bovina em tecidos têm sido usados em aplicações de investigação em alguns países (FURLANETTO et al., 2012), mas sem impacto significativo sobre os procedimentos de diagnóstico em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil.

O interesse pelos métodos moleculares tem se intensificado devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da tuberculose em animais, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente etiológico pelos métodos bacteriológicos de rotina (COSTA et al., 2013).

Para a utilização das técnicas moleculares como PCR e PCR tempo real vários oligonucleotídeos têm sido desenhados com o objetivo de diagnosticar

bactérias do CMT, como por exemplo, os iniciadores que amplificam segmentos do elemento IS6110 (EISENACH et al., 1990; HERMANS et al., 1990).

O desenvolvimento de um fragmento genômico espécie-específico para *M. bovis* foi idealizado em 1995 por Rodriguez e colaboradores, com um produto final de 500 pares de base, contido na região RvD1Rv2031c, JB-21 e JB-22 (RODRIGUEZ et al., 1995). Em estudos posteriores, RODRIGUEZ et al. (1999), ao ampliarem a amostragem, observaram que algumas amostras da espécie estreitamente relacionada, *M. tuberculosis*, também apresentam uma banda de 500 pares de bases, quando submetidas a amplificação por PCR, o que não diminui o potencial do ensaio, indicando a presença do agente infeccioso a partir do CMT.

Apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de novos ensaios de diagnóstico molecular com identificação mais rápida e precisa do CMT em amostras humanas, apenas alguns ensaios foram descritos para detecção de CMT em homogeneizados de tecidos de bovinos (TRACKER et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Em um dos primeiros estudos com tecidos, Wards; Collins; De Lisle (1995) testaram 110 amostras de tecidos animais submetidos a isolamento em cultura, com diferentes técnicas de extração de DNA e PCR com iniciadores para o gene que codifica a proteína MPB70 e em sequência com IS1081. A PCR identificou 53 positivos em 58 tecidos que apresentaram cultura positiva.

Com o advento da PCR em tempo real (ou *quantitative* PCR - qPCR) a qual permite a detecção e visualização em tempo real da amplificação de fragmentos de DNA a cada ciclo, mediante o uso de marcadores fluorescentes, Taylor et al. (2001) avaliaram 38 amostras de tecidos bovinos com lesões compatíveis de tuberculose e encontraram 93% de sensibilidade, quando comparado com cultura, além da redução significativa do tempo de diagnóstico, cerca de 9 horas, a cultura levaria em média 90 dias.

Em uma pesquisa, comparando-se os métodos de cultivo e PCR com 109 amostras de tecido bovino (com lesão visível), 98 (89,9%) foram positivas na cultura e destas, 69 (70%) positivas na PCR tendo como alvo IS1081. Em outras 95 amostras de tecido bovino com lesão visível, 86 foram positivos em cultivo, e destas amostras o diagnóstico por PCR detectou 78 (90%) resultados positivos. Os autores relatam a dificuldade em extrair DNA de *M. bovis* de tecidos e quando aplicaram

modificações no método de extração a técnica se mostrou mais sensível 90% (TAYLOR et al., 2007).

Parra et al. (2008) testaram dois métodos diferentes de extração de DNA (manual e mecanizada) de 125 amostras de tecido bovino (TCC+) utilizando qPCR com iniciadores para a região 16S-23S rDNA e encontraram alta especificidade e sensibilidade maior para a extração manual. A sensibilidade variou de 61,11% para as amostras sem lesões visíveis a 80,64% para lesões crônicas, com sensibilidade média de 73,87% quando se utiliza o sistema de extração manual e 47,74% quando utilizou-se o modelo mecanizado. Mas neste estudo, os autores não encontraram amplificação (por PCR) em amostras sem lesões visíveis e negativas em cultura.

Em estudo utilizando PCR multiplex com oligonucleotídeos direcionados para as sequências genômicas RvD1Rv2031c e IS6110, específicas para *M. bovis* e complexo *Mycobacterium tuberculosis* (respectivamente), de colônias isoladas a partir de lesões sugestivas de tuberculose bovina, 88,24% das colônias foram identificadas como *M. bovis* (FIGUEIREDO et al., 2009).

Ao avaliar 30 homogeneizados de tecido bovino, previamente identificados como *M. bovis* em cultura, Thacker et al. (2011) identificaram 20/30 (66,6%) amostras positivas para *M. bovis* com iniciadores para IS6110 e IS6110_T (este último desenhados pelos autores). Com a técnica utilizada não houve amplificação em 18 controles negativos. Neste estudo qPCR teve uma menor sensibilidade quando comparada com a cultura, mas o número limitado de amostras é um fator a ser considerado.

Furlanetto et al. (2012) utilizaram métodos complementares de diagnóstico (histopatológicos, bacteriológicos e moleculares) em amostras de tecido 198 bovinos com lesões suspeitas de tuberculose, observadas em frigoríficos. *M. bovis* foi isolado em três amostras (1,5%) e quando utilizaram um sistema de PCR multiplex, direcionados para as sequências genômicas RvD1Rv2031c e IS6110, detectou-se a presença desta bactéria em 14/198 amostras (7%), incluindo as três amostras positivas no cultivo.

Em uma pesquisa buscando concentrar e isolar (por separação imunomagnética com anticorpos monoclonais) *M. bovis* antes do cultivo e PCR com IS6110 em 280 linfonodos de bovinos (206 com lesões e 74 sem lesões visíveis) coletados no momento do abate, Stewart et al. (2013) encontraram 62,1% amostras positivas na cultura e 57,8% por PCR.

Há evidências de taxas maiores de detecção de *M. bovis* usando abordagens para concentrar as células de micobactérias antes da extração de DNA aumentando a sensibilidade da amostra para PCR. No entanto, estas etapas geralmente envolvem mais passos na técnica além do material de consumo e equipamentos (COSTA et al., 2013).

Em estudo recente, utilizando extração de DNA de tecido bovino com *kit* comercial *QIAamp Mini* (Qiagen) e diagnóstico por *nested* PCR e cultivo de 69 bovinos, Costa et al. (2013) descreveram sensibilidade de 100% e especificidade de 97,7% com *nested* PCR. Os resultados do cultivo apresentaram 37,7% de amostras positivas para *M. bovis*. de Nessa pesquisa, iniciadores foram desenhados para IS6110. O grupo também relata a amplificação por *nested* PCR de 08 amostras sem lesões compatíveis com tuberculose e que foram negativas na cultura. O tempo para o diagnóstico foi de aproximadamente 6 horas, o que possibilita sua realização antes que a carcaça seja liberada para comercialização.

Comparações no genoma de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, evoluíram para dois subtipos de um ancestral comum, cerca de 40.000 anos atrás: subtipos definidos pela presença ou ausência de *M. tuberculosis* deleção 1 (TbD1) (WIRTH et al., 2008). Os dados sugerem que os dois subtipos surgiram em seres humanos, com TbD1- subtipo 1 co-evolução principalmente nos seres humanos e TbD1+ subtipo 2 co-evoluindo em seres humanos, ruminantes, e em outras espécies (WATERS et al., 2011).

Até o presente, métodos moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina têm sido realizados a partir de PCR convencional e tempo real dirigidas ao CMT. Acredita-se que a alternativa para identificação rápida e específica de *M. bovis* em fragmentos de tecido de bovinos e bubalinos com suspeita de tuberculose, seria a abordagem por meio de ensaios de *nested* PCR, aumentando a sensibilidade e reduzindo o tempo de diagnóstico (COSTA et al. 2013).

Face aos estudos realizados sobre a identificação direta do agente da tuberculose em tecidos de bovinos e bubalinos, percebe-se que existe demanda por testes mais específicos e sensíveis, que explorem novos genes alvo e possam diagnosticar amostras paucibacilares. Assim, este estudo propôs o desenvolvimento de um sistema de *nested* PCR, com combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar complexo *Mycobacterium tuberculosis* (artigo 1) e a espécie *Mycobacterium bovis* (artigo 2) em homogeneizados de tecidos.

Adicionalmente, especificidade e sensibilidade analítica e clínica das técnicas de *nested* PCR foram analisadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Detectar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a espécie *Mycobacterium bovis* diretamente de homogeneizados de tecido de bovinos e bubalinos por *nested* PCR.

3.2 Específicos

- ✓ Desenhar oligonucleotídeos iniciadores e sondas para amplificação de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (alvo *rv2807*) e *Mycobacterium bovis* (região TbD1);
- ✓ Descrever o desenvolvimento e avaliação de dois sistemas de *nested* PCR, com combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e da espécie *Mycobacterium bovis* em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 08, p. 1296-1299, 2010.
- ARANAZ, A. et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 16, p. 785-1789, 2003.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Norma Interna SDA 02/2012**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2012. 04p.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 184p.
- BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.
- COROS A, et al. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.9, p. 3408-3410, 2008.
- COSTA, P. et al. Enhanced Detection of Tuberculous *Mycobacteria* in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. **Plos One**, v.8, n.11 e81337, 2013.
- COUSINS, D. V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1305-1334, 2003.
- EISENACH, K. D. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977-981, 1990.
- FIGUEIREDO, E. E. S. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n. 2, p.231-233, 2009.
- FURLANETTO, L. V. et al. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1138-1144, 2012.
- HERMANS, P. W. M. et al. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1204-1213, 1990.

MEDEIROS, L. S. et al. Potential Application of New Diagnostic Methods for Controlling Bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.41, n. 3, p. 531-541, 2010.

PARRA, A. et al. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3-4, p. 315-324, 2008.

RODRIGUEZ, J. G. et al. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p. 2131-2138, 1995.

RODRÍGUEZ, J. G., et al. Amplification of a 500-base pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2330-2332, 1999.

STEWART, L. D. et al. Improved Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in Bovine Lymph Node Tissue Using Immunomagnetic Separation (IMS)-Based Methods. **Plos One**, v. 8, n. 3, e58374, 2013.

TAYLOR, G. M. et al. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, 3:12, 2007 Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/12>>. Acesso em: 09 de abril de 2014.

TAYLOR, M. J. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Specimens Using Real-Time Fluorescence and Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Rapid-Cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1272–1278, 2001.

THACKER, T. C. et al. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. **BMC Veterinary Research**, 7:50, 2011. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/50>>. Acesso em 09 de Abril de 2014.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 4, p. 653-655, 2012.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M., DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2-3, p. 227-240, 1995.

WATERS, W. R. et al. Tuberculosis Immunity: Opportunities from Studies with Cattle. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004413/>>. Acesso em: 09 de Abril de 2014.

WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 9, e1000160, 2008.

ARTIGO 1

DETECÇÃO DIRETA DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS POR
NESTED PCR

1 **Detecção direta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de**
2 **bovinos e bubalinos por *nested* PCR**

3
4 **Cristina Pires de Araújo¹; Ana Luiza Alves Rosa Osório¹; Kláudia dos Santos Gonçalves**
5 **Jorge¹; Carlos Alberto do Nascimento Ramos²; Antonio Francisco de Souza Filho¹;**
6 **Carlos Eugênio Soto Vidal³; Agueda Palmira Castagna Vargas³; Eliana Roxo⁴; Adalgiza**
7 **Rocha⁵; Philip Suffys⁵; Antônio Augusto Fonseca Júnior⁶; Marcio Roberto Silva⁷; José**
8 **Diomedes Barbosa Neto⁸; Valéria Duarte Cerqueira⁸; Flábio Ribeiro de Araújo^{9/*}**

9
10 ¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS,
11 Brasil;² Bolsista DTI- CNPq, Campo Grande, MS, Brasil; ³PPGMV-UFSM, Santa Maria, RS,
12 Brasil; ⁴Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ⁵Fundação Oswaldo Cruz, Rio
13 de Janeiro, RJ, Brasil; ⁶Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil;
14 ⁷Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; ⁸UFPA, Castanhal, PA; ⁹Embrapa Gado de
15 Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

16
17 *Autor Correspondente endereço: Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, CEP 79106-
18 550, Campo Grande, MS, Brasil. Tel.: +55 67 3368-2069. E-mail: flabio.araujo@embrapa.br (Flábio
19 R. Araújo).

20
21
22
23
24
25
26
27

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Resumo

O diagnóstico *post-mortem*, a cultura bacteriana e os testes bioquímicos específicos são atualmente realizados para caracterizar o agente etiológico da tuberculose bovina. As culturas podem levar até 90 dias para se desenvolver. O diagnóstico por testes moleculares, tais como PCR podem proporcionar resultados rápidos e confiáveis, reduzindo significativamente o tempo de confirmação. No presente estudo, um sistema de *nested* PCR baseado no alvo *rv2807*, realizado com PCR convencional seguido por PCR em tempo real, foi desenvolvido para detectar bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) diretamente de homogeneizados de tecidos. A sensibilidade e a especificidade das reações foram avaliadas com amostras de DNA extraídas de micobactérias tuberculosas e não tuberculosas, bem como outras espécies de Actinomycetales e amostras de DNA obtidas diretamente de homogeneizados de tecidos da espécie bovina e bubalina. Os valores de sensibilidade analítica por *nested* PCR foram 1,5 pg de DNA de *M. bovis* cepa AN5 e 6,1 pg de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. O sistema de *nested* PCR apresentou 100% de especificidade analítica para CMT, quando testado com DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas e outros Actinomycetales. A sensibilidade clínica da *nested* PCR foi de 76,7% detectada com tecidos de amostras positivas para CMT por cultura e PCR convencional. Evidenciou-se especificidade clínica de 100% com DNA de amostras de tecidos de bovinos, com resultados negativos no teste cervical comparativo (TCC). Estes animais não apresentavam lesões visíveis e foram negativos por cultura e *nested* PCR para CMT. O uso de *nested* PCR para detectar o complexo *M. tuberculosis*, em homogeneizados de tecidos, permitiu rápido diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina.

Palavras-chave: tuberculose bovina e bubalina; PCR em tempo real; *nested* PCR dos tecidos; inspeção sanitária

55 **Introdução**

56 A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo
57 *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*,
58 *M. caprae*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. pinnipedii* e *M. cannettii* (Brosch *et al.*, 2002). Embora *M. bovis*
59 seja o agente mais comum da tuberculose em bovinos, outras espécies do CMT também tem sido
60 detectadas, incluindo *M. tuberculosis* (Ameni *et al.*, 2011), *M. caprae* (Sahraoui *et al.*, 2009) e *M.*
61 *africanum* (Weber *et al.*, 1998).

62 No Brasil o controle da tuberculose bovina e bubalina envolve o abate de animais infectados
63 identificados por teste de reação intradérmica com derivado proteico purificado (PPD – *Purified*
64 *Protein Derivative*). A vigilância epidemiológica também é realizada em frigoríficos, bem como
65 inspeções sanitárias de todos os animais abatidos para consumo (Brasil, 2004).

66 Com o advento da globalização econômica, as barreiras tarifárias foram substituídas por
67 barreiras sanitárias. Há uma pressão crescente de mercados importadores para o diagnóstico definitivo
68 da tuberculose bovina, nos animais que apresentam lesões compatíveis com tuberculose (LCT), pelo
69 país exportador.

70 Embora o cultivo bacteriológico seja um método confiável para detectar CMT de forma
71 definitiva, uma quantidade significativa de tempo (até 90 dias) é necessária para sua realização, uma
72 vez que os membros deste complexo crescem lentamente quando comparados com os padrões
73 bacteriológicos gerais (Costello *et al.*, 1998; de Leslie *et al.*, 2008; Drobniowski *et al.*, 2003; Hines *et*
74 *al.*, 2006; Miller *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002). Neste sentido, é importante ressaltar que os
75 sistemas de diagnóstico moleculares baseados na tecnologia PCR em tempo real são mais rápidos e
76 oferecem maiores possibilidades de automação (Soini e Musser, 2001).

77 Embora muitos sistemas de PCR em tempo real tenham sido desenvolvidos para detectar
78 diretamente CMT de amostras biológicas em seres humanos, o desenvolvimento de um procedimento
79 para detectar CMT em homogeneizados de tecidos de animais tem sido ainda pouco explorado (Parra
80 *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2007; Thacker *et al.*, 2011).

81 As principais limitações são a dificuldade em extrair DNA de micobactérias em amostras de
82 tecido bovino devido ao número limitado de bactérias e à estrutura da própria amostra biológica que
83 apresenta intensa fibrose e calcificação, dificultando o processo de extração (Liébana *et al.*, 1995).

84 Outra dificuldade envolve a concentração de DNA de micobactérias, que geralmente é baixa
85 quando comparada com a concentração de DNA do hospedeiro (Thacker *et al.*, 2011). Um terceiro
86 problema é que os bovinos com reações positivas ao teste de tuberculinização nem sempre apresentam
87 lesões visíveis durante o abate (Costello *et al.*, 1997), devido a infecções recentes com uma baixa
88 carga de micobactérias.

89 Para superar os problemas de sensibilidade na detecção de micobactérias patogênicas
90 diretamente de tecidos bovinos e bubalinos, o presente estudo descreve uma abordagem utilizando
91 *nested* PCR, com uma combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar CMT em
92 homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

93

94 **Materiais e Métodos**

95

96 Amostras biológicas

97 Na Tabela 1 são apresentadas as cepas bacterianas de referência utilizadas para a análise da
98 sensibilidade analítica, testes de especificidade e padronização de *nested* PCR. Estas cepas incluem os
99 membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium*
100 *tuberculosis*), complexo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium*), micobactérias ambientais e
101 não-tuberculosas (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*,
102 *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium smegmatis*) e outros Actinomycetales (*Corynebacterium*
103 *pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi*).

104

105

106

107 **Tabela 1** - Cepas bacterianas utilizadas para avaliar a especificidade e sensibilidade analítica da *nested*
 108 PCR.

Cepasbacterianas	Origem
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LGCM/FIOCRUZ*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5, Ministério da Agricultura – LANAGRO-MG
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium goodii</i>	ATCC 14470/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 700044/FIOCRUZ
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939/FIOCRUZ

109 * Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Qualidade em Saúde

110

111 Amostras de DNA também foram obtidas a partir das seguintes fontes: cultura isoladas de
 112 lesões de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* cedidas pelo Ministério da Agricultura -
 113 LANAGRO, MG, Brasil (n = 50), Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (n = 42), DNA extraído a
 114 partir de 170 cultura de *M. tuberculosis*, obtidas a partir de humanos com tuberculose (LABMAM
 115 Fiocruz, RJ, Brasil), DNA de amostras de cultura (n = 3) de *M. avium* também cedidas pelo
 116 LANAGRO-MG. As cepas de *M. avium* foram identificadas utilizando métodos bioquímicos padrão
 117 (amostras do LANAGRO-MG) e *M. bovis* por PCR com iniciadores JB21 e JB22 para CMT
 118 (Rodriguez *et al.*, 1995). As cepas de *M. tuberculosis* foram identificadas utilizando *spoligotyping*
 119 (Kamerbeek *et al.*, 1997) e PCR para o polimorfismo do gene *pncA* (Bauroni *et al.*, 2004).

120 A cepa de referência de *M. bovis* AN5 foi cultivada em meio Stonebrink, enquanto que as
 121 outras cepas de referência de *Mycobacterium* sp. foram cultivadas em meio de Löwenstein-Jensen.
 122 Cepas não-micobacterianas não foram cultivadas e DNA foi purificado diretamente a partir das
 123 suspensões bacterianas liofilizadas.

124 Extração de DNA de cepas bacterianas

125 O DNA de bactérias de referência foi purificado com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen),
 126 seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração das amostras de DNA foram
 127 avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, *Thermo Scientific*) e eletroforese em gel de
 128 agarose a 0,8% corado com *SYBR Gold* (Invitrogen).

129 Iniciadores e sonda

130 Com base nas sequências de DNA de membros do CMT disponíveis no Gen Bank-NCBI
 131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com o auxílio do programa BLAST, disponível em
 132 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, alvos específicos foram selecionados para amplificação de DNA. A
 133 sonda e iniciadores para *nested* PCR foram desenhados usando o *software Primer Express v2.0*
 134 (*Applied Biosystems*).

135 O alvo selecionado para amplificação foi *rv2807* (ID: 888907), um gene de 443 pb que
 136 codifica para uma proteína hipotética do complexo *M. tuberculosis*.

137 Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: iniciadores externos, para amplificação por
 138 PCR convencional, e os iniciadores internos e sonda, *TaqMan* MGB para amplificação por PCR em
 139 tempo real. A primeira reação foi incluída para enriquecer as amostras de DNA, uma vez que a
 140 concentração relativa mais elevada do DNA do hospedeiro isolado a partir de tecidos de bovinos pode
 141 interferir na amplificação do gene alvo.

142 A Tabela 2 mostra as sequências dos iniciadores e sonda

143

144 **Tabela 2** - Iniciadores e sonda utilizados com a primeira reação de PCR convencional e a segunda
 145 reação de PCR em tempo real para complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

146

Gene alvo	Sequência DNA
<i>rv2807</i> - complexo <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	Iniciador externo 5' - 3' CMT: GGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAG
	Iniciador externo 3' - 5' CMT: GCCGCGAGCGAGTCTGGGCGATGTC
	Iniciador interno 5' - 3' CMT: CATTGCTGCGTAATTCGATCA
	Sonda CMT: 6FAM CATCCACACCTGTTTCG MGB-NFQ
	Iniciador interno 3' - 5' CMT: GACCTTGGGCGCCTCAT

147

148

149

150

151 Padronização de *Nested* PCR

152 A primeira reação (PCR convencional) foi feita em volume total de 25 µL, contendo: 10 mM
153 de Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 7,5 pmol de cada
154 iniciador; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Sigma) e 400 ng de DNA.

155 A segunda reação (PCR em tempo real) para CMT foi realizada em volume total de 12,5 µL,
156 contendo: 6,25 µL de *TaqMan Master Mix* (ref 4.352.042, *Applied Biosystems*), 600 nM de cada
157 iniciador, 100 nM de sonda e 3 µL da primeira reação de PCR.

158 Na primeira reação as amplificações foram realizadas em um termociclador da marca MJ Mini
159 Bio-Rad. A desnaturação inicial foi realizada a 95°C durante 4 minutos, seguido por 35 ciclos de
160 desnaturação a 95°C durante 90 segundos, hibridação a 65°C durante 30 segundos, e extensão a 72°C
161 durante 45 segundos. Um passo final de extensão a 72°C foi realizada durante 3 minutos. As
162 amplificações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador *Step One Plus* (*Applied*
163 *Biosystems*, EUA). O programa de termociclagem foi composto por: desnaturação inicial a 95°C
164 durante 10 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e
165 anelamento/extensão a 62°C durante 30 segundos.

166 Para todas as reações de *nested* PCR, DNA de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv foram
167 usados como controle positivo. Para controle negativo foi utilizado água livre de nucleases.

168 A sensibilidade analítica dos iniciadores para CMT foi avaliada com diluições seriadas de
169 DNA de cepas de referência de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv, em triplicata, com reações
170 separadas para cada réplica. Cada amostra de DNA foi testada apenas por PCR em tempo real, apenas
171 por PCR convencional e *nested* PCR (ambas as reações).

172 Os iniciadores e sonda para CMT foram testados quanto à sensibilidade com DNA das 92
173 culturas de *M. bovis* de bovinos naturalmente infectados, fornecidas pelo LANAGRO, Instituto
174 Biológico, bem como 170 amostras de DNA obtidas a partir de culturas de *M. tuberculosis* isolados de
175 humanos naturalmente infectados.

176 Para as avaliações de especificidade, os iniciadores e sonda para CMT foram testadas com 50
177 ng de DNA de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium*
178 *avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium*

179 *smegmatis* e *Rhodococcus equi*. Para avaliar a presença de inibidores de PCR, alíquotas de DNA das
180 espécies acima, usadas para avaliar a especificidade, foram misturadas com DNA de *M. bovis* AN5 e
181 testadas por *nested* PCR. As condições de amplificação foram as mesmas que as do alvo específico.

182

183 Detecção direta de CMT em tecidos de bovinos e búfalos

184 Detecção direta do CMT em homogeneizados de tecidos foi realizada com amostras de 113
185 bovinos e 46 búfalos (*Bubalus bubalis*) dos seguintes grupos:

186 a) Setenta e seis animais positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC), incluindo 45 bovinos com
187 lesão compatível com tuberculose (LCT) e 31 sem lesões visíveis (SLV). Estes animais, de diferentes
188 idades e categorias zootécnicas (leite e carne) foram abatidos seguindo as diretrizes do Programa
189 Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal PNCEBT (Brasil, 2004).

190 b) Vinte e três bovinos negativos ao TCC e sem lesões visíveis (SLV). Esses animais vieram de uma
191 fazenda de exploração mista (leite e carne), com história prévia de tuberculose bovina.

192 c) Sessenta bovinos sem histórico de TCC, incluindo 59 animais com LCT e um SLV.

193 O Teste Cervical Comparativo foi realizado seguindo as diretrizes do PNCEBT (Brasil, 2004).

194 Uma reação TCC positiva foi definida como um aumento relativo da espessura da dobra da pele no
195 local de aplicação do PPD bovino superior a pelo menos 4 mm que o aumento da espessura da pele no
196 local de aplicação do PPD aviário (Brasil, 2004).

197 No presente estudo, lesões compatíveis com tuberculose (LCT) foram obtidas a partir de
198 linfonodos: hepático, ilíaco, mandibular, mediastínico, mesentérico, pré-escapular, retrofaríngeo e
199 brônquico, bem como fragmentos de órgãos: pulmões, amígdalas, fígado e diafragma. Quando os
200 bovinos não apresentavam lesões visíveis (SLV), fragmentos de (fígado, linfonodo mediastino,
201 mesentérico, retrofaríngeo e traqueobrônquico) foram coletados.

202 Os órgãos foram mantidos refrigerados até chegarem ao laboratório, onde foram armazenados
203 a -30°C até o processamento. Em seguida, foram descongelados e divididos em duas amostras: uma
204 para a cultura e a outra para a extração de DNA direto de tecido.

205 Para realizar a extração de DNA, as amostras foram cortadas em fragmentos de
206 aproximadamente 100 mg, correspondente à transição entre as áreas de lesão macroscópica e área

207 aparentemente saudável. Estes fragmentos foram completamente homogeneizados com 1 mL de
208 solução salina tamponada com fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). A partir destas suspensões
209 de tecidos, 200 µL foram utilizadas para extração de DNA com Kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen),
210 seguindo as instruções do fabricante. Reações de *nested* PCR foram realizadas como descrito acima.

211 Para cultura, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com uma quantidade
212 equivalente de areia estéril e água. As suspensões de tecido foram filtradas através de uma gaze estéril
213 e centrifugadas a 1200 xg durante 15 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de água
214 estéril, utilizando o método de descontaminação de Petroff, e cultivadas em meio Stonebrink. As
215 culturas foram incubadas a 37°C e observadas para busca de colônias durante pelo menos 90 dias com
216 observações semanais. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados utilizando método de Ziehl-
217 Neelsen (ZN) para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Todas as culturas de BAAR foram
218 analisadas por PCR convencional utilizando os iniciadores JB21 e JB22 para CMT (Rodriguez *et al.*,
219 1995).

220 Os animais foram considerados positivos para tuberculose quando pelo menos uma amostra de
221 tecido apresentava amplificação por *nested* PCR ou quando colônias de BAAR foram confirmadas na
222 PCR convencional com iniciadores JB21 e JB22.

223

224 Análise estatística

225 O teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado foram realizados para avaliar a associação
226 entre as variáveis categóricas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando
227 $p \leq 0,05$.

228

229

230

231

232

233

234 **Resultados**

235 As análises realizadas *in silico* com as sequências dos iniciadores e sonda estão mostradas na
236 Figura 1. Identidade completa foi detectada apenas com espécies do CMT, tais como *M. bovis*
237 (incluindo BCG), *M. tuberculosis*, *M. africanum*. Identidade parcial foi observada com *M. canettii*, *M.*
238 *abscessus*, *M. avium*, *M. gilvum*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. rhodesiae*, *M. smegmatis*
239 e *M. ulcerans* (Figura 1).

240 Quanto à sensibilidade analítica, detectou-se DNA de *M. bovis* AN5 até: 390,6 pg por PCR
241 convencional, 24,4 pg por PCR em tempo real e 1,5 pg por *nested* PCR. Para DNA de *M. tuberculosis*
242 H37Rv detectou-se até 6,1 pg por PCR convencional, 24,4 pg por PCR em tempo real e 6,1 pg por
243 *nested* PCR.

244 Das 50 amostras de DNA isoladas a partir de culturas de bovinos naturalmente infectados com
245 *M. bovis* (Ministério da Agricultura - LANAGRO), 49 (98,8%) foram positivas na *nested* PCR para
246 CMT. Todas as 42 amostras (100%) de DNA isoladas de culturas de *M. bovis* do Instituto Biológico
247 de São Paulo foram positivas pela *nested* PCR para CMT. Das 170 amostras de cultura de *M.*
248 *tuberculosis* isoladas de escarro de humanos com tuberculose (LABMAM, Fiocruz, RJ, Brasil), 100%
249 foram positivas em *nested* PCR para CMT.

250 A especificidade analítica por *nested* PCR para CMT foi testada usando DNA de *C.*
251 *pseudotuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* e
252 *R. equi*. Não houve amplificação quando utilizaram-se 50 ng de DNA destes agentes. Amplificações
253 foram visualizadas com DNA *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo.

254 Para avaliar a presença de inibidores de PCR, misturaram-se alíquotas de DNA de bactérias
255 não-alvo com DNA de *M. bovis* AN5. Detectaram-se amplificações, o que mostra que não houve
256 interferência por inibidores de PCR

257

258

259

rv2807

Iniciadores

	Iniciador externo	Iniciador interno	Sonda	Iniciador Interno	Iniciador externo
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97 (BX248339)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	---CATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	---GACATCGCCAGACTCGCTCGGGC
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Mexico (CP002095)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Moreau (AM412059)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Tokyo (AP010918)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Pasteur (AM408590)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> RGTB423 (CP003234)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> RGTB327 (CP003233)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC35801 (AP012340)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> UT205 (HE608151)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CTRI2 (CP002992)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC5180 (CP001642)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC5979 (CP001641)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN4207 (CP001662)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN1435 (CP001658)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (BX842573)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11 (CP000717)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (CP00611)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (AE000516)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium avium</i> 104 (CP000479)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium avium</i> 2151 (AF143772)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium africanum</i> GM041182 (FR878060)	AGGGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAGC	CACCATTGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	CGGACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> (AE016958)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium canettii</i> (HE572590)	---GAGTCAAGTGGCCGAGTTGAAGGCGATGAGT	CTCGGCTGGCTGCGTAATTOGATCAC	ATCCACACCTGTTTCG	ATGAGGCGCCCAAGGTC	---ACATCGCCAGACTCGCTCGGGCGTA
<i>Mycobacterium intracellulare</i> (CP003323)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium rhodesiae</i> (CP003169)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium gilvum</i> (CP000656)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (CP000480)	---	---	---	---	---
<i>Mycobacterium abscessus</i> (CU458896)	---	---	---	---	---

Figura 1-Alinhamento das seqüências de sonda e iniciadores para *rv2807* do complexo *Mycobacterium tuberculosis* com a seqüência alvo em diferentes isolados e espécies de *Mycobacterium*. As áreas destacadas em preto indicam identidade nucleotídica entre os isolados.

260 Amostras de tecidos de 159 bovinos e bubalinos foram testadas diretamente por *nested* PCR
 261 para CMT. Os resultados de *nested* PCR e cultura são apresentados na Tabela 3.

262

263 **Tabela 3** - *Nested* PCR para complexo *Mycobacterium tuberculosis* e os resultados de cultura de 159
 264 homogeneizados de tecidos bovinos e bubalinos

Condição	Nº total	Teste	Nº de positivos (%)	Valor de P
TCC + e LCT	45	<i>Nested</i> PCR	32 (71,1)	0,318
		Cultura *	37 (82,2)	
TCC + e SLV	31	<i>Nested</i> PCR	17 (54,8)	0,124
		Cultura *	10 (32,2)	
TCC- e SLV	23	<i>Nested</i> PCR	0 (0,0)	0,999
		Cultura *	1 (4,3)	
Sem TCC e LCT	59	<i>Nested</i> PCR	33 (55,9)	0,015
		Cultura *	19 (32,2)	
Sem TCC e SLV	1	<i>Nested</i> PCR	0 (0,0)	-----
		Cultura *	1 (100,0)	

269

TCC = Teste cervical comparativo

270

LCT = Lesão compatível com tuberculose

271

SLV = Sem lesão visível

272

BAAR= Bacilos álcool-ácido-resistente

273

*Confirmado por PCR convencional com iniciadores JB21 e JB22 (Rodriguez *et al.*, 1995).

274

275 No Brasil, o TCC é considerado teste *in vivo* referência na confirmação de infecção por *M.*
 276 *bovis* em bovinos e bubalinos. Dos 76 animais TCC+ descritos no presente estudo, 47 animais foram
 277 positivos na cultura (61,8%) e 49 foram positivos para CMT por *nested* PCR (64,4%) (p = 0,86).

278 Dos 45 bovinos e bubalinos TCC+ e com LCT, 32 (71,1%) foram positivos para CMT por
 279 *nested* PCR e 37 (82,2%) foram positivos na cultura, e confirmados por PCR com JB21 e JB22 (p =
 280 0,318) (Tabela 3). Dos 31 bovinos e bubalinos TCC+ e SLV, 17 (54,8%) foram positivos para CMT
 281 por *nested* PCR e 10 (32,2%) foram positivos na cultura, confirmados por PCR JB21 e JB22 (p =
 282 0,124) (Tabela 3).

283 O número de animais positivos para tuberculose foi estatisticamente superior no grupo TCC+
284 com LCT que no grupo TCC+ e SLV, tanto por *nested* PCR para CMT ($p = 0,0001$) como na cultura
285 ($p = 0,0001$).

286 Dos 76 animais TCC+, 31 (40,7%) não apresentaram lesões visíveis durante a inspeção de
287 abate. Desses animais, 7 (22,5%) foram positivos tanto na cultura como na *nested* PCR para CMT.

288 No grupo de 21 animais TCC+ e SLV com culturas negativas, 10 animais foram positivos na
289 *nested* PCR para CMT.

290 Dos 59 bovinos e bubalinos com LCT, mas não testados anteriormente pelo TCC, 33 (55,9%)
291 foram positivos para CMT na *nested* PCR e 19 (32,2%) foram positivos na cultura, o que foi
292 confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22 ($p = 0,015$).

293 Na análise de 23 animais TCC- provenientes de uma fazenda com histórico de tuberculose
294 bovina, não houve animais positivos na *nested* PCR para CMT. No entanto, um animal (4,3%) foi
295 positivo na cultura, conforme confirmado por PCR com JB21 e JB22.

296 Nas análises dos 104 animais que exibiram LCT, 65 animais foram positivos para CMT na
297 *nested* PCR (62,5%) e 56 animais foram positivos na cultura (53,8%) ($p = 0,261$).

298 Considerando-se a presença de lesões compatíveis com tuberculose confirmadas por cultura e
299 PCR, 56 animais foram positivos, dos quais 43 também foram positivos para CMT por *nested* PCR,
300 resultando em uma sensibilidade clínica de 76,7%. Vinte e dois animais sem lesões visíveis, e com
301 TCC e culturas negativas, foram negativos também na *nested* PCR para CMT, determinando uma
302 especificidade clínica de 100%.

303

304 **Discussão**

305 O objetivo do presente estudo foi desenvolver um sistema de diagnóstico *post-mortem* da
306 tuberculose bovina e bubalina, rápido e aplicável diretamente a amostras clínicas de bovinos e
307 bubalinos. Aliado a isso, desenvolver um método preciso que possa reduzir substancialmente o tempo
308 entre detecção de lesões compatíveis e diagnóstico etiológico (2 dias) quando comparado com o
309 método tradicional de cultura, que pode demorar até 90 dias.

310 Um dos problemas com a detecção do complexo *M. tuberculosis* diretamente a partir de lesões
311 que são compatíveis com a tuberculose é que os tecidos apresentam geralmente fibrose e calcificação
312 intensa, dificultando o acesso ao DNA das micobactérias (Liébana *et al.*, 1995). Três kits comerciais
313 de purificação de DNA foram testados usando tecidos de bovinos que apresentam lesões causadas por
314 *M. bovis* (dados não mostrados). Os melhores resultados foram obtidos com kit *DNeasy Blood &*
315 *Tissue* (Qiagen), quanto a qualidade do DNA e a detecção do CMT por *nested* PCR.

316 A análise das diluições seriadas de DNA da cepa de referência *M. bovis* AN5 revelou uma
317 maior sensibilidade analítica para *nested* PCR quando comparada com PCR em tempo real ou PCR
318 convencional isoladamente, embora a diferença mais notável seja demonstrada quando comparamos
319 *nested* PCR ou PCR em tempo real com PCR convencional. Quando DNA de *M. tuberculosis* H37Rv
320 foi utilizado, as técnicas de *nested* PCR e PCR convencional apresentaram sensibilidades semelhantes.
321 Já PCR em tempo real isoladamente mostrou-se mais sensível.

322 Apesar de não ser esperado que o diagnóstico por PCR convencional mostrasse sensibilidade
323 analítica semelhante ao teste de *nested* PCR na identificação de DNA de *M. tuberculosis*, a primeira
324 necessita de processamento pós-amplificação (por exemplo, eletroforese em gel), contribuindo para o
325 aumento no tempo de processamento. O impacto da utilização da abordagem por *nested* PCR
326 provavelmente será maior em relação à sensibilidade clínica, como no presente caso, uma vez que os
327 inibidores de PCR e micobactérias atípicas podem interferir com o desempenho da reação de PCR
328 convencional. A opção por uma estratégia de *nested* PCR (primeira reação de PCR convencional e em
329 seguida PCR em tempo real) também foi considerada por Thacker *et al.* (2011), resultando em
330 aumento da sensibilidade clínica para a detecção de *M. bovis* diretamente de amostras de tecidos.

331 A análise realizada *in silico* dos iniciadores/sonda para CMT revelou identidade completa com
332 os membros do CMT, exceto com *M. canettii*, com o qual houve identidade parcial. No entanto, *M.*
333 *canettii* é um patógeno humano (Brosh *et al.*, 2002), e acredita-se ser raro e limitado aos países da
334 África Oriental (Reddington *et al.*, 2011).

335 A especificidade analítica da *nested* PCR foi verificada *in vitro*. Não houve amplificação
336 quando os iniciadores e sonda foram usados com DNA de micobactérias ambientais como *M.*
337 *abcessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. smegmatis*, sem amplificação

338 também com DNA de *R. equi* e *C. pseudotuberculosis*. Isto é particularmente significativo, uma vez
339 que micobactérias ambientais em linfonodos submetidos a testes de diagnóstico podem confundir os
340 ensaios que não possuem especificidade suficiente (Thacker *et al.*, 2011). Além disso, outros
341 Actinomycetales como *R. equi* e *C. pseudotuberculosis* podem causar lesões confundíveis com
342 tuberculose (Flynn *et al.*, 2001; Sahraoui *et al.*, 2009).

343 Não houve diferença estatisticamente significativa entre a *nested* PCR para CMT e a cultura
344 nos grupos de animais TCC+ com LCT ou TCC+ SLV. No entanto, a *nested* PCR e a cultura exibiram
345 uma maior sensibilidade na detecção de animais TCC+ com LCT do que aqueles com TCC+ SLV.
346 Este é um claro indicador da maior carga de micobactérias no grupo com lesões. A mesma tendência
347 de maior sensibilidade no grupo de animais com LCT foi descrita por Parra *et al.* (2008). No entanto,
348 nesse estudo de Parra *et al.* os autores não conseguiram detectar animais positivos no grupo SLV, que
349 também eram negativos em cultura. No grupo de animais TCC+ SLV no presente estudo, a *nested*
350 PCR para CMT foi capaz de detectar animais positivos para tuberculose mesmo quando estas amostras
351 eram negativas em cultivo.

352 Menores taxas de positividade foram encontradas pela *nested* PCR e cultura no grupo de
353 animais sem TCC que apresentavam LCT durante a inspeção de abate. Uma das possíveis razões para
354 este resultado é a presença de lesões granulomatosas causadas por outros agentes. O isolamento de
355 micobactérias atípicas em bovinos com lesões de tuberculose disseminada é raro, devido ao caráter
356 crônico e não-progressivo das infecções. No entanto, foram relatados alguns casos de doença
357 disseminada (Oloya *et al.*, 2007). Lesões causadas por outras bactérias que não sejam micobactérias
358 como *Rhodococcus*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium* e *Nocardia*, entre outras (de Lisle *et al.*, 2002),
359 também podem ser confundidas com tuberculose.

360 No Brasil, bovinos com resultados positivos ao TCC ou que apresentem lesões compatíveis
361 com tuberculose durante as inspeções de abate, são considerados positivos para a tuberculose.
362 Considerando o cultivo confirmado por PCR como teste de referência *post-mortem*, uma sensibilidade
363 clínica de 76,7% foi detectada. Os resultados de *nested* PCR apresentaram 100% de especificidade
364 clínica e foram obtidos em um curto período de tempo (2 dias), em contraste com a cultura (até 90
365 dias). A sensibilidade de 76,7% de *nested* PCR pode ser subestimada, pois estes animais eram todos

366 TCC+. Culturas falso-negativas podem ocorrer devido à natureza paucibacilar de tecidos selecionados,
367 e procedimentos de descontaminação que são um pré-requisito para a cultura, o que pode reduzir
368 significativamente a viabilidade de micobactérias, entre outros motivos.

369 Várias abordagens têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade da PCR em tempo real
370 para a identificação de *Mycobacterium* sp. diretamente de homogeneizados de tecido. Parra *et*
371 *al.*(2008) utilizaram uma sonda de captura para isolar DNA de homogeneizados de tecidos com
372 micobactérias, conseguindo menor sensibilidade (65,6%) do que foi aqui relatado. Taylor *et al.* (2007)
373 apresentaram uma sensibilidade de 70% ao realizar PCR diretamente sobre homogeneizados de
374 tecidos, embora a sensibilidade tenha aumentado para 91% quando modificaram o método de extração
375 de DNA. Thacker *et al.* (2011) utilizaram uma estratégia similar a do presente estudo, com uma
376 primeira PCR convencional e uma segunda reação em tempo real. Embora os autores tenham utilizado
377 outro alvo (*IS6110*), detectaram 66,7% de amostras positivas em tecidos positivos em cultura.

378 Uma das preocupações do teste *nested* PCR em particular com PCR em tempo real é a
379 possibilidade de contaminação cruzada. Durante todo o processo de extração de DNA as luvas foram
380 trocadas com frequência. A purificação de DNA foi realizada em capela de biossegurança nível três, e
381 PCR em gabinete de fluxo laminar com luz UV. Conjuntos separados de micropipetas foram utilizados
382 para extração de DNA e PCR. Ponteiras com filtro foram usadas rotineiramente. Superfícies e
383 equipamentos em contato com microtubos de amostras foram limpos antes de cada ensaio.

384 Durante a inspeção de abate em frigorífico, a principal preocupação são os animais que
385 apresentam lesões visíveis, que são consideradas impróprios para o consumo. No entanto, nas
386 amostras de bovinos e bubalinos do presente estudo, 40,7% dos animais TCC+ não apresentavam
387 lesões. Destas amostras 22,5% foram positivas tanto na cultura como na *nested* PCR para CMT, o que
388 representa risco para a transmissão zoonótica de *M. bovis*. As principais espécies do CMT encontradas
389 em bovinos podem sobreviver ao processo de cozimento (Van der Merwe *et al.*, 2009). Por esta razão,
390 as políticas sanitárias que envolvem testes de PCR em tecidos de animais TCC+ SLV devem ser
391 consideradas.

392 Todos os 23 bovinos TCC- também foram negativos na *nested* PCR, mas um animal foi
393 positivo em cultura, o que foi confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22. A fazenda em que

394 estes animais foram criados tem histórico de tuberculose bovina. Animais com estágios avançados de
395 tuberculose podem não reagir ao TCC, mas, este animal não apresentou lesões ao abate.

396

397 **Conclusões**

398 A utilização do ensaio de *nested* PCR para detectar bactérias do complexo *M. tuberculosis* em
399 homogeneizados de tecidos proporciona um diagnóstico rápido da tuberculose bovina e bubalina. Um
400 estudo em grande escala e uma validação inter-laboratorial do método são necessários para determinar
401 a viabilidade do teste para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
402 Animal.

403

404 **Agradecimentos**

405 Os autores agradecem ao CNPq (processos 578278/2008, 479394/2011-3 e 310165/2010-5),
406 FUNDECT (processos 23/200.152/2009 e 23/200.582/2012) e CAPES (bolsa de doutorado) pelo
407 apoio financeiro e a Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
408 pelo fornecimento das amostras bacterianas de referência.

409

410 **Referências**

- 411 Ameni G, Vordermeier M, Firdessa R, Aseffa A, Hewinson G, Gordon SV, Berg S (2011)
412 *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. Vet J 188 (3):359-61.
- 413 Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE (2004) A *pncA* polymorphism to
414 differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes 18
415 (3):167–170.
- 416 Brasil (2004) Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal–
417 PNCEBT. Manual Técnico, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- 418 Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C,
419 Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Van Soolingen D, Cole ST (2002) A
420 new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA
421 99 (6):3684-3689.

- 422 Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF (1998) A study of cattle-to-cattle
423 transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 155 (3):245-250.
- 424 Costello EJ, Egan W, Quigley FC, O'Reilly PF (1997) Performance of the single intradermal
425 comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec*
426 141 (9):222-224.
- 427 de Lisle GW, Bengis RG, Schmitt SM, O'Brien DJ (2002) Tuberculosis in free-ranging wildlife:
428 detection, diagnosis and management. *Rev Sci Tech* 21 (2):317-334.
- 429 de Lisle GW, Kawakami RP, Yates GF, Collins DM (2008) Isolation of *Mycobacterium bovis* and
430 other mycobacterial species from ferrets and stoats. *Vet Microbiol* 132 (3-4):402-407.
- 431 Drobniewski FA, Gibson A, Ruddy M, Yates MD (2003) Evaluation and utilization as a public health
432 tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United
433 Kingdom from 1997 to 2001. *J Clin Microbiol* 41 (5):1861-1868.
- 434 Flynn O, Quigley F, Costello E, O'Grady D, Gogarty A, McGuirk J, Takai S (2001) Virulence-
435 associated protein characterisation of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. *Vet*
436 *Microbiol* 78 (3):221-228.
- 437 Hines N, Payeur JB, Hoffman LJ (2006) Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates
438 using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11
439 solid media. *J Vet Diagn Invest* 18 (3):243-250.
- 440 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A,
441 Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain
442 differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*
443 35 (4):907-914.
- 444 Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez
445 G, Domingo M, Dominguez L (1995) Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*
446 complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* 33 (1):33-36.
- 447 Miller JM, Jenny AL, Payeur JB (2002) Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium*
448 *tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from
449 culture-negative ruminants. *Vet Microbiol* 87 (1):15-23.
- 450 Oloya J, Kazwala R, Lund A, Opuda-Asibo J, Demelash B, Skjerve E, Johansen TB, Djønne B (2007)
451 Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda.
452 *BMC Microbiol* 7:95.

- 453 Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso JM (2008)
454 Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on
455 bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol*127 (3-4):315–324.
- 456 Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, Van Soolingen D, Barry T (2011) A novel
457 multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic
458 tuberculosis. *Plos One* 6 (8):e23481.
- 459 Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA (1995) Species-specific
460 identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 141 (Pt 9):2131-2138.
- 461 Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, Berg S, Smith NH, Zinsstag J
462 (2009) Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle
463 slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet Res* 5:4.
- 464 Schmitt SM, O'Brien DJ, Bruning-Fann CS, Fitzgerald SD (2002) Bovine tuberculosis in Michigan
465 wildlife and livestock. *Ann N Y AcadSci*969:262-268.
- 466 Soini H, Musser JM (2001) Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 47 (5):809-814.
- 467 Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of *Mycobacterium*
468 *bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 3:12.
- 469 Thacker TC, Harris B, Palmer MV, Waters WR (2011) Improved specificity for detection of
470 *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using *IS6110* real-time PCR. *BMC Vet Res*7:50.
- 471 Van der Merwe M, Bekker JL, Van der Merwe P, Michel AL (2009) Cooking and drying as effective
472 mechanisms in limiting the zoonotic effect of *Mycobacterium bovis* in beef. *J S Afr Vet Assoc* 80
473 (3):142-145.
- 474 Weber A, Reischl U, Naumann L (1998) Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull from
475 North Bavaria. *Berl MunchTierarztl Wochenschr* 111 (1):6-8.
- 476

2 ARTIGO

DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* EM TECIDOS DE BOVINOS E
BUBALINOS UTILIZANDO *NESTED* PCR PARA TbD1

1 **Detecção direta de *Mycobacterium bovis* em tecidos de bovinos e bubalinos**
2 **utilizando *nested* PCR para TbD1**

3

4 **Cristina P. Araújo¹, Ana Luiza A. R. Osório¹, Kláudia S. G. Jorge¹, Carlos Alberto N. Ramos²,**
5 **Antonio Francisco S. Filho¹, Carlos Eugênio S. Vidal³, Eliana Roxo⁴, Christiane Nishibe⁵, Nalvo**
6 **F. Almeida⁵, Antônio A. F. Júnior⁶, Marcio R. Silva⁷, José Diomedes B. Neto⁸, Valéria D.**
7 **Cerqueira⁸, Martín J. Zumárraga⁹, Flábio R. Araújo^{10*}**

8

9 **1** Programa de Pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Brasil, **2**
10 Bolsista DTI-CNPq, Campo Grande, MS, Brasil, **3** PPGMV-UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, **4**
11 Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, **5** Faculdade de Computação, UFMS, Campo
12 Grande, MS, Brasil, **6** Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil, **7** Embrapa
13 Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil, **8** UFPA, Castanhal, PA, **9** Instituto de Biotecnología,
14 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, **10** Embrapa Gado de Corte,
15 Campo Grande, MS, Brasil.

16

17 Citação: Araújo CP, Osório ALAR, Jorge KSG, Ramos CAN, Sousa Filho AF, et al. (2013) Detection
18 of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. Plos One, v.9,
19 n.3, e91023, 2014

20 * E-mail: flabio.araujo@embrapa.br

21 Endereço para correspondência: Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, CEP 79106-550,
22 Campo Grande, MS, Brasil. Tel.: +55 67 3368-2069.

23

24

25

26

27

28

29 Resumo

30 No presente estudo, um sistema de *nested* PCR, que envolve a realização de PCR convencional
31 seguida por PCR em tempo real, tendo como alvo a região TbD1, foi desenvolvida para detectar
32 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos. A
33 sensibilidade e a especificidade das reações foram avaliadas com amostras de DNA obtidas a partir de
34 micobactérias tuberculosas e não-tuberculosas bem como outras espécies de Actinomycetales e DNA
35 de amostras obtidas diretamente a partir de homogeneizados de tecidos da espécie bovina e bubalina.
36 Quanto à sensibilidade analítica, detectou-se DNA *M. bovis* AN5 dentro dos seguintes níveis: 1,56 ng
37 por PCR convencional, 97,6 pg com PCR em tempo real e 1,53 pg por *nested* PCR (duas reações). A
38 *nested* PCR apresentou 100% de especificidade analítica para *M. bovis*, quando testado com DNA de
39 cepas de referência de micobactérias ambientais e outros Actinomycetales. A sensibilidade clínica foi
40 de 76,0%, detectada com amostras de tecido provenientes de animais que apresentaram resultado
41 positivo no teste de cervical comparativo (TCC), assim como aqueles com lesões compatíveis com
42 tuberculose (LCT), que apresentaram culturas positivas. A especificidade clínica de 100% foi
43 detectada em amostras de tecido de animais com resultados negativos no TCC, sem lesões visíveis
44 (SLV) e com resultado negativo na cultura. Não foram encontradas diferenças significativas entre
45 *nested* PCR e cultura para detectar animais positivos ao TCC com LCT ou SLV. Assim como em
46 animais TCC negativos e SLV. No entanto, a *nested* PCR detectou um número significativamente
47 superior de animais positivos que cultura no grupo de animais que exibiam LCT sem registros
48 anteriores de TCC. A utilização do ensaio de *nested* PCR para detectar *M. bovis* em homogeneizados
49 de tecidos proporcionou diagnóstico rápido da tuberculose bovina e bubalina.

50

51

52

53

54

55

56 **Introdução**

57 A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo
58 *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* [1], *M.*
59 *africanum* [2], *M. canettii* [3], *M. caprae* [4], *M. pinnipedii* [5], *M. mungi* [6] e *M. orygis* [7]. Embora
60 *M. bovis* seja a espécie mais frequentemente envolvida em casos de tuberculose, outras espécies do
61 CMT também já foram detectadas [7,8,9].

62 A tuberculose bovina e bubalina provoca prejuízos financeiros em muitos países e representa
63 risco zoonótico [10]. No Brasil o controle da tuberculose bovina e bubalina é regulamentado pelo
64 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT. Este
65 programa envolve o abate de bovinos, com reações positivas no teste de tuberculinização (diagnóstico
66 *ante-mortem*) e da inspeção de carcaças com lesões macroscópicas nos frigoríficos (diagnóstico *post-*
67 *mortem*) [11]. No entanto, há uma crescente pressão dos mercados internacionais de carne bovina para
68 o diagnóstico definitivo da tuberculose em bovinos apresentando lesões compatíveis com tuberculose
69 (LCT). A partir de 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determinou
70 que as fazendas com casos de tuberculose bovina e bubalina estão proibidas de exportar carne bovina
71 para a União Eurasiática (União Aduaneira composta por Bielorrússia, Cazaquistão e Rússia). Todos
72 os lotes de animais de uma propriedade com animais suspeitos serão sequestrados e as LCT enviadas a
73 um laboratório oficial para o diagnóstico etiológico [12].

74 A cultura é considerada “padrão de ouro” e é o teste definitivo para a confirmação da
75 tuberculose bovina. No entanto, o diagnóstico microbiológico de *M. bovis* é um processo
76 extremamente lento, que pode demorar dois a três meses. Aliado a isso, mais duas a três semanas são
77 necessárias para a identificação bioquímica dos isolados [13]. Portanto a necessidade de sistemas de
78 diagnóstico rápido é evidente. Os sistemas de diagnóstico molecular, particularmente aqueles com
79 base em tecnologia de PCR em tempo real, apresentam resultados em até dois dias [14].

80 O objetivo do presente estudo foi descrever o desenvolvimento e avaliação de um sistema de
81 *nested* PCR, envolvendo uma reação convencional seguida por PCR em tempo real para detectar *M.*
82 *bovis* em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

83

84 **Materiais e Métodos**

85

86 **Amostras biológicas**

87 Na Tabela 1 são apresentadas as cepas bacterianas de referência utilizadas para a avaliação da
 88 sensibilidade analítica ou ensaios de especificidade (*M. kansasii*, *M. smegmatis*, e *R. equi*), bem como
 89 a otimização de *nested* PCR. Estas cepas incluem membros do CMT (*M. bovis* e *M. tuberculosis*),
 90 *Mycobacterium avium* (*M. avium*), micobactérias ambientais e não-tuberculosas (*Mycobacterium*
 91 *abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii* e
 92 *Mycobacterium smegmatis*), e outras Actinomycetales (*Corynebacterium pseudotuberculosis*,
 93 *Rhodococcus equi*).

94

95 **Tabela 1.** Cepas padrão de bactérias utilizadas para a avaliação da especificidade ou sensibilidade
 96 analítica de *nested* PCR para a região gênica TbD1 de *Mycobacterium bovis*.

Cepasbacterianas	Origem
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LGCM/FIOCRUZ*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5, Ministério da Agricultura – LANAGRO-MG
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC 14470/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 700044/FIOCRUZ
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939/FIOCRUZ

97 *Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

98

99 Outras amostras biológicas também foram utilizadas: a) DNA obtido a partir de amostras de
 100 culturas isoladas de lesões de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. Estas amostras eram de
 101 animais abatidos que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose (LCT) durante a inspeção sanitária
 102 de rotina e as mesmas lesões foram submetidas a diagnóstico etiológico pelo Ministério da Agricultura
 103 - LANAGRO, MG, Brasil (n = 50) e Instituto Biológico, São Paulo, Brasil (n = 42) como
 104 regulamentado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
 105 PNCEBT [11]; b) DNA extraído de amostras de cultura (n = 3) de *M. avium* cedidas também pelo

106 LANAGRO-MG. *M. bovis* e *M. avium* foram isolados e identificados por métodos bioquímicos padrão
107 (amostras do LANAGRO-MG) ou PCR com os iniciadores JB21 e JB22 para CMT [15]. A cepa de
108 referência de *M. bovis* AN5 foi cultivada em meio Stonebrink, enquanto outras cepas de referência de
109 *Mycobacterium* sp. foram cultivados em Löwenstein-Jensen e meio Middlebrook. As cepas não-
110 micobacterianas não foram cultivadas e DNA foi purificado diretamente a partir de suspensão
111 bacteriana liofilizada.

112

113 **Extração de DNA de cepas bacterianas**

114 DNA das bactérias de referência foram purificados com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen),
115 seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração das amostras de DNA foram
116 avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, *Thermo Scientific*) e eletroforese em gel de
117 agarose a 0,8%, corado com *SYBR Gold* (Invitrogen).

118

119 **Iniciadores e sonda**

120 Com base em sequências de DNA de membros do CMT disponíveis no GenBank-NCBI
121 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com auxílio do programa BLAST disponível em
122 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, alvos específicos foram selecionados para amplificação de DNA de *M.*
123 *bovis*. Os iniciadores e sonda para *nested* PCR foram desenhados usando software *Primer Express*
124 v2.0 (*Applied Biosystems*).

125 O alvo selecionado para amplificação foi a região TbD1, que compreende o gene *mmpS6* (ID:
126 1092456) e a região 5' de *mmpL6*. Essa região (TbD1) está presente em *M. bovis* (incluindo cepas de
127 BCG), *M. africanum*, *M. canettii* e isolados ancestrais africanos de *M. tuberculosis*. Em linhagens
128 modernas de *M. tuberculosis*, *mmpS6* está ausente e *mmpL6* é truncado [03,16,17].

129 Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: iniciadores externos, para a amplificação por
130 PCR convencional, e os iniciadores internos e sonda, para amplificação por PCR em tempo real com
131 *TaqMan* MGB. A primeira reação foi incluída para enriquecer o DNA de *M. bovis*, uma vez que a
132 concentração relativa mais elevada do DNA do hospedeiro isolado de tecidos de bovinos, pode

133 interferir na amplificação do gene alvo. As sequências dos iniciadores e da sonda são apresentadas na
134 Tabela 2.

135 **Tabela 2.** Iniciadores e sonda utilizadas na primeira reação (PCR convencional) e na segunda reação
136 (PCR em tempo real) para TbD1 de *Mycobacterium bovis*.

Região alvo	Sequência de DNA
TbD1	Iniciador externo 5' - 3': GTGGCGGTTCGCGGGATTCAGCGTCTAT
	Iniciador externo 3' - 5': GCGGTCTTCGCCAATGTT
	Sonda: 6FAM TCGCGCAAGGCGA MGBNFQ
	Iniciador interno 5' - 3': GCAGCCGATGGAATTGCT
	Iniciador interno 3' - 5': TTATGGCGGCCACACCCACCCAAAACAG

137

138 **Padronização de *Nested* PCR**

139 A PCR convencional (primeira reação) foi realizada em volume de 25 µL, contendo 10 mM de
140 Tris-HCl (pH 8.3); 50 µM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 7,5 pmol de cada
141 iniciador, 1,25 U de *Taq DNA* polimerase (Sigma) e 400 ng de DNA.

142 A reação de PCR em tempo real (segunda reação) para CMT foi realizada com volume total de
143 12,5 µL, contendo 6,25 µL de *TaqMan Master Mix* (ref 4352042, *Applied Biosystems*), 600 nM de
144 cada iniciador, 100 nM de sonda e 3 µL do produto da primeira reação de PCR.

145 A amplificações foram realizadas em termociclador MJ Mini (Biorad). Uma etapa de
146 desnaturação inicial foi realizada a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C
147 por 90 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos. Um ciclo
148 final de extensão a 72°C por 3 minutos foi realizado. Para amplificação por PCR em tempo real, as
149 amostras foram realizadas em termociclador *Step One Plus* (*Applied Biosystems*, USA). Uma etapa de
150 desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15
151 segundos e anelamento/extensão a 62°C por 30 segundos.

152 Para todas as reações de *nested* PCR, um controle positivo com DNA de *M. bovis* AN5, um
153 controle negativo sem DNA e um controle negativo com DNA de *M. tuberculosis* H37Rv foram
154 incluídos.

155 A especificidade analítica dos iniciadores e sonda para *M. bovis* foi avaliada com 50 ng de
156 DNA de *C. pseudotuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M.*
157 *smegmatis* e *R. equi*. Uma vez que TbD1 está ausente em cepas modernas de *M. tuberculosis*, a cepa
158 H37Rv também foi testada na análise da especificidade analítica de *nested* PCR.

159 Para avaliar a presença de inibidores de PCR, alíquotas de DNA das espécies acima usadas
160 para avaliar a especificidade foram contaminadas artificialmente com DNA de *M. bovis* AN5 e
161 testadas em *nested* PCR. As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para o alvo
162 específico.

163 Os iniciadores e a sonda foram avaliados quanto à sensibilidade analítica com diluições
164 seriadas de DNA da cepa de referência *M. bovis* AN5, em triplicata, mas com um *mix* de reação para
165 cada réplica. As amostras de DNA foram testadas por PCR em tempo real e PCR convencional de
166 forma isolada e *nested* PCR (reações convencional e em tempo real). Para *nested* PCR o volume da
167 primeira reação foi de 25 µL.

168 Os iniciadores e sonda foram também testados quanto à sensibilidade analítica com DNA
169 extraído de 92 culturas de *M. bovis* obtidas a partir de lesões de bovinos naturalmente infectados,
170 fornecidas pelo LANAGRO e Instituto Biológico.

171

172 **Deteção direta de *Mycobacterium bovis* em tecidos de bovinos e búfalos**

173 A deteção direta de *M. bovis* em homogeneizados de tecidos foi realizada com amostras de
174 tecido de 167 bovinos e 62 búfalos (*Bubalus bubalis*) de rebanhos comerciais. Nenhum animal foi
175 sacrificado para este estudo. As amostras foram coletadas durante a inspeção sanitária de rotina em
176 frigoríficos nos grupos:

177 a) 127 animais positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC+) incluindo 80 com lesões
178 compatíveis com tuberculose (LCT) e 47 sem lesões visíveis (SLV). Estes animais de diferentes faixas
179 etárias e categorias zootécnicas (leite e carne) foram abatidos seguindo as recomendações do PNCEBT
180 [11].

181 b) 51 animais negativos ao TCC (TCC-) e SLV. Esses animais eram provenientes de uma
182 fazenda de exploração mista (leite e carne) com história prévia de tuberculose.

183 c) 51 animais sem registro de TCC, mas com LCT, e originários de uma fazenda de
184 exploração mista, detectados durante as inspeções de rotina nos frigoríficos.

185 Testes cervicais comparativos foram realizados de acordo com os regulamentos do PNCEBT
186 [11]. Uma reação TCC+ foi definida como aumento relativo da espessura da pele no local de aplicação
187 de PPD (*Purified Protein Derivative*) bovino de no mínimo 4 mm maior do que o aumento da
188 espessura da pele no local de aplicação da PPD aviária [11].

189 Para este estudo, LCT foram obtidas de linfonodos: hepáticos, ilíacos, mediastínicos,
190 mesentéricos, pré-escapulares, retrofaríngeos e traqueobrônquicos, ou de pulmões, amígdalas, fígado e
191 diafragma. Quando o animal não apresentava lesões visíveis, linfonodos hepáticos, mediastínicos,
192 mesentéricos, retrofaríngeos e traqueobrônquicos foram coletados. Os órgãos foram conservados sob
193 refrigeração até chegarem ao laboratório, onde foram mantidos à temperatura de -30°C até
194 processamento. Os órgãos foram descongelados e divididos em duas alíquotas: uma para a cultura e
195 isolamento e outra para a extração de DNA.

196 Para extração de DNA, as amostras foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 100
197 mg, correspondente à transição entre as áreas de lesões macroscópicas e aparentemente saudáveis.
198 Estas peças foram completamente homogeneizadas com 1 mL de solução salina tamponada com
199 fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). A partir destas suspensões, 200 µL foram utilizados para
200 extração de DNA com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.
201 Reações de *nested* PCR foram realizadas como descritas acima.

202 Para cultura, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com uma quantidade
203 equivalente de areia estéril e solução salina. As suspensões de tecido foram filtradas em gaze estéril e
204 centrifugadas a 1200 xg durante 15 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de solução
205 salina estéril, utilizando o método de descontaminação de Petroff [18] e cultivadas em meio
206 Stonebrink. As culturas foram incubadas a 37°C e procurou-se por colônias durante pelo menos 90
207 dias, com observações semanais. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados pelo método de
208 Ziehl-Neelsen (ZN) para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Todas as culturas de BAAR foram
209 analisadas por PCR para CMT com os iniciadores JB21 e JB22 [15].

210 Os animais foram considerados positivos para a tuberculose quando em ao menos uma
211 amostra de tecido houve amplificação em *nested* PCR ou culturas apresentaram colônias de BAAR
212 confirmadas por PCR com os iniciadores JB21 e JB22. Os bovinos ou bubalinos foram considerados
213 negativos para tuberculose quando as culturas não apresentaram nenhuma colônia BAAR ou quando
214 eram BAAR, mas negativas na PCR para CMT com iniciadores JB21 e JB22 e quando os tecidos
215 foram negativos por *nested* PCR.

216

217 **A análise estatística**

218 A concordância entre *nested* PCR e cultura foi avaliada pelo índice *Kappa*, tal como descrito
219 por Ansari-Lari [19]. Comparações pareadas foram realizadas pelo teste de McNemar, com nível de
220 significância de 0,05. O teste de Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram realizados para avaliar a
221 associação entre as variáveis categóricas, com o nível de significância de 0,05. O qui-quadrado para
222 tendência linear também foi utilizado e, sempre que possível, regressão logística univariada foi
223 realizada para avaliar se houve uma relação de dependência entre os níveis de evidência presuntiva
224 para a tuberculose bovina e o diagnóstico do agente. Com base em uma combinação de ambos os
225 diagnósticos (TCC e LCT) e resultado de *nested* PCR para cada nível de "exposição", um *odds ratio*
226 foi calculado para comparar a proporção de resultados positivos com nível básico ou nível 0 (TCC
227 negativo e sem lesões visíveis) [20].

228

229 **Resultados**

230 A análise *in silico* dos iniciadores e sonda para TbD1 são mostrados na Figura 1. Identidade
231 completa com *M. bovis* AF2122/97 e diferentes cepas de *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. canettii*
232 disponíveis no GenBank-NCBI. Uma completa identidade também foi encontrada com sete cepas de
233 *M. bovis* da Argentina e 11 cepas de *M. bovis* do Brasil, cujos genomas foram sequenciados por este
234 grupo de pesquisa. Para *M. tuberculosis*, os iniciadores e sonda apresentaram identidade completa com
235 uma cepa ancestral (número de acesso no GenBank AJ426486) [03], mas não foi detectada homologia
236 com as cepas de *M. tuberculosis* modernas disponíveis no GenBank.

237 Não houve amplificação nos seguintes casos: DNA da cepa *M. tuberculosis* H37Rv ou de
238 isolados clínicos de *M. tuberculosis*; DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas
239 *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. kansasii* e *M. smegmatis*; DNA de outros
240 Actinomycetales: *C. pseudotuberculosis*, *R. equi*.

241 Alíquotas de DNA de bactérias não-alvo artificialmente contaminadas com DNA de *M. bovis*
242 AN5 foram positivas por *nested* PCR.

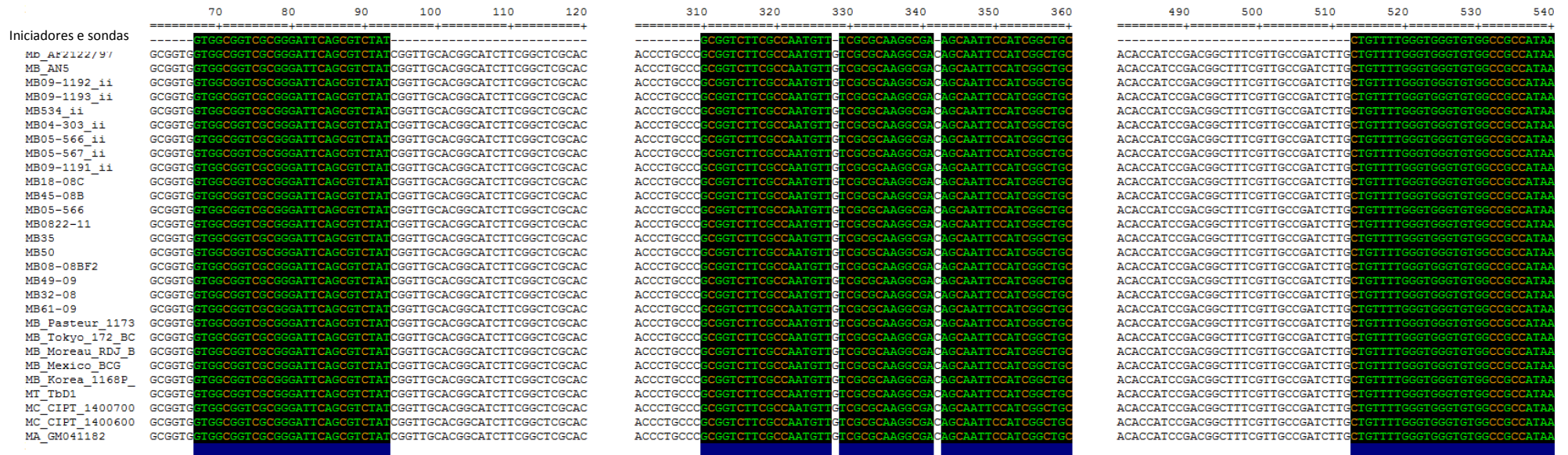
243 Os níveis de detecção encontrados para sensibilidade analítica utilizando DNA de *M. bovis*
244 AN5 foram até 1,56 ng por PCR convencional, 97,6 pg por PCR em tempo real e 1,53 pg por *nested*
245 PCR. Das 50 amostras de DNA (de cultivo) isoladas a partir de lesões de animais naturalmente
246 infectados com *M. bovis* cedidas pelo Ministério da Agricultura - LANAGRO, 49 (98,0%) foram
247 positivas em *nested* PCR para *M. bovis*. Todas as 42 (100%) amostras de DNA isoladas de culturas de
248 *M. bovis* do Instituto Biológico, São Paulo, foram positivas por *nested* PCR para *M. bovis*.

249 Amostras de tecido de 229 bovinos e ou bubalinos foram testadas diretamente por *nested* PCR
250 para *M. bovis*. Os resultados de *nested* PCR e cultura estão mostrados na Tabela 3. Alíquotas de DNA
251 de tecidos sem lesão e negativas em *nested* PCR foram contaminadas artificialmente com DNAs de *M.*
252 *bovis* e re-testadas com *nested* PCR cepa AN5 mostrando resultados positivos. Dos 51 animais com
253 resultados TCC- e SLV, 50 exibiram culturas negativas. Estes 50 animais foram incluídos no cálculo
254 da especificidade clínica, que foi de 100%. Dos 50 animais com resultados TCC+ LCT e culturas
255 positivas, 38 também foram positivos por *nested* PCR, o que corresponde a uma sensibilidade clínica
256 de 76,0%.

257

258

259



MB = *Mycobacterium bovis*
 MT = *Mycobacterium tuberculosis* cepa ancestral AJ426486
 MC = *Mycobacterium canettii*
 MA = *Mycobacterium africanum*

Figura 1 . Análise *in silico* das sequências dos iniciadores e sondas para TbD1 de *Mycobacterium bovis*. As áreas destacadas em preto indicam identidade nucleotídica entre os isolados.

260 **Tabela 3.** Resultados de *nested* PCR para Tbd1 de *Mycobacterium bovis* e cultura de 229
 261 homogêneos de tecido de bovinos e bubalinos.

262

	Condição		Número Total	Teste		Valor de P	Odds ratio	
	<i>Ante-mortem</i>	<i>Post-mortem</i>		Cultura* (%)	<i>Nested</i> PCR (%)		Cultura	<i>Nested</i> PCR
263	TCC-	SLV	51	1 (1,96)a	0 (0,00)a	1	1,00A	1,00A
264	Sem TCC	LCT	51	11 (21,57)a	21 (41,18)b	0,0329	13,75B	72,61B
265	TCC+	LCT	80	50 (62,50)a	49 (61,25)a	0,8707	15,27B	59,10B
		SLV	47	11 (23,40)a	17 (36,17)a	0,176	83,33C	161,86C
266	Total		229	73 (31,88)	87 (37,99)	0,17	---	---

267 TCC = Teste cervical comparativo

268 LCT = Lesão compatível com tuberculose

269 SLV = Sem lesões visíveis

270 *Confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22 [15]

271 Valor de P para Qui-quadrado de tendência linear < 0,001

272 Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações pareadas
 273 dos testes cultura e *nested* PCR

274 Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam proporções diferentes de positivos ($p < 0,05$)

275

276 Com relação à concordância entre *nested* PCR e cultura, houve 51 animais *nested* PCR e
 277 cultura positiva (22,27%), 120 animais *nested* PCR e cultura negativa (52,40%), 36 animais *nested*
 278 PCR+ e cultura negativa (15,72%), e 22 animais *nested* PCR negativo e cultura positiva (9,61%). A
 279 concordância avaliada pelo índice *Kappa* foi de 0,445, com erro padrão de 0,061 e um intervalo de
 280 confiança de 95% 0,325-0,565. O grau de concordância foi considerada moderada [19].

281 Não houve diferenças significativas entre *nested* PCR e cultivo na detecção de animais TCC+
 282 com LCT ou SLV. Também não foram encontradas diferenças significativas na identificação de
 283 animais TCC negativos SLV. No entanto a *nested* PCR revelou um número significativamente maior
 284 de animais positivos quando comparado com cultura no grupo de animais sem histórico de TCC, mas
 285 com LCT ($p < 0,05$).

286 Houve uma tendência linear entre o aumento da evidência presuntiva da tuberculose bovina e
 287 as chances de resultados positivos em cultura ($p < 0,001$) ou *nested* PCR ($p < 0,001$). Os resultados
 288 presuntivos de TCC+ com LCT tiveram 13,75 e 15,27 vezes mais chance de um resultado positivo em

289 cultura e 59,10 e 72,61 vezes mais chance de um resultado positivo por *nested* PCR respectivamente,
290 quando comparado com o grupo sem resultados presuntivos. No grupo com os dois resultados
291 presuntivos positivos, LCT e TCC, houve 83,33 e 161,86 vezes mais chance de um resultado positivo
292 em cultura e *nested* PCR quando comparado com o grupo sem resultados presuntivos, respectivamente
293 (Tabela 3).

294

295 **Discussão**

296 Um dos sistemas mais importantes aplicados ao controle da tuberculose bovina por *M. bovis* é
297 a vigilância epidemiológica de animais abatidos em frigoríficos. Esta vigilância é realizada por
298 inspeção e coleta de amostras com LCT, confirmando a existência da infecção por meio da cultura e
299 detecção molecular, que pode levar semanas, até que o resultado seja obtido [21].

300 O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema *post-mortem* de diagnóstico para
301 tuberculose bovina e bubalina aplicável diretamente a amostras clínicas, o qual poderia reduzir
302 substancialmente o tempo entre a detecção de animais TCC+ com LCT e o diagnóstico etiológico
303 quando comparado com o método tradicional de cultura, que pode demorar até 90 dias.

304 Um sistema de *nested* PCR visando o alvo TbD1 foi desenvolvido. Esta região compreende o
305 gene *mmpS6* e a região 5' de *mmpL6*, que estão presentes nos genomas de *M. bovis*, *M. africanum*, *M.*
306 *canettii* e cepas ancestrais de *M. tuberculosis* [03, 22]. Como esperado, a análise das sequências dos
307 iniciadores e sonda para TbD1 exibiu identidade completa com as espécies descritas acima do CMT.
308 No entanto, existe pouca informação genômica sobre as cepas de campo de *M. bovis* para avaliar a
309 conservação das sequências alvo da *nested* PCR. Nosso grupo de pesquisa sequenciou os genomas de
310 sete isolados de *M. bovis* da Argentina e 11 do Brasil e as sequências alvo foram conservadas em todas
311 as 18 cepas (dados não mostrados).

312 A especificidade analítica de *nested* PCR foi analisada *in vitro*. Não houve amplificação
313 quando os iniciadores e sonda para TbD1 foram usados com DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ou a
314 partir de amostras clínicas isoladas de culturas de *M. tuberculosis*. No entanto apenas H37Rv foi
315 testado no presente estudo e este é um genótipo moderno de *M. tuberculosis* [23].

316 Há relatos de *M. tuberculosis* infectando bovinos em todo o mundo [24,25,26,27]. No Brasil
317 mais de 2000 amostras de cultura de bovinos com lesões presuntivas de tuberculose foram testadas
318 para *M. tuberculosis* no LANAGRO-MG (Ministério da Agricultura) e não houve resultados positivos
319 (A. A. Fonseca Júnior, 2013, comunicação pessoal).

320 Não houve amplificação com os iniciadores e sonda para TbD1 quando DNA de micobactérias
321 ambientais como *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. smegmatis* foram
322 utilizadas. Isto é particularmente significativo uma vez que micobactérias ambientais presente em
323 linfonodos e submetidas a testes de diagnóstico, podem confundir os ensaios que carecem de
324 especificidade suficiente [34]. Além disso, Actinomycetales estreitamente relacionados com
325 micobactérias tais como *R. equi* e *C. pseudotuberculosis* podem causar lesões similares à tuberculose e
326 podem ser diagnosticados erroneamente [35, 36].

327 Neste estudo DNA de *M. africanum* ou *M. canettii* espécies que são TbD1+, não foram
328 testadas por *nested* PCR para TbD1. No entanto, ambas as espécies são essencialmente agentes
329 patogênicos de humanos [03,37] e não foram descritos no Brasil. Uma série de relatos de *M.*
330 *africanum* em bovinos têm sido descritos na Europa e na Ásia [08,38,39]. A importância
331 epidemiológica deste patógeno em bovinos deve ser esclarecida principalmente em países do novo
332 mundo.

333 Tradicionalmente a sensibilidade e especificidade clínica para as reações de PCR para
334 tuberculose são avaliadas com amostras de tecidos que são positivas ou negativas na cultura de
335 *Mycobacterium* sp., uma vez que cultura é considerada o teste de diagnóstico “padrão ouro” para
336 tuberculose [21]. Neste sentido, *nested* PCR apresentou sensibilidade clínica moderada e elevada
337 especificidade clínica. No entanto, para utilização de uma ferramenta de diagnóstico adicional como
338 parte de um programa de controle e erradicação da tuberculose animal, esta informação é limitada.
339 Dependendo do estágio da doença ou mesmo a condição da amostra biológica, a PCR pode detectar
340 mais animais positivos do que cultura [21] ou vice-versa [40,41]. A viabilidade é outro fator
341 importante, já que as carcaças em frigoríficos com LCT exigem resultados rápidos de diagnóstico.

342 No presente estudo, 36 animais que foram detectados como positivos tanto pela *nested* PCR
343 quanto por cultura, correspondem a 15,72% do número de amostras testadas. Outros indícios de que

344 estes animais estavam realmente infectados incluem a presença de outras evidências presuntivas da
345 tuberculose em todos os animais (26 animais TCC+; 21 com LCT; 11 TCC+ e LCT). Por outro, lado
346 havia 22 animais positivos em cultura, mas negativos por *nested* PCR (9,61%). Uma vez que
347 diferentes métodos de purificação de DNA a partir de tecidos podem influenciar na presença de
348 inibidores de PCR da amostra a ser testada [42], alíquotas de DNA de tecidos de 22 culturas *+/nested*
349 PCR- foram contaminadas com DNA de *M. bovis* cepa AN5 e re-testados por *nested* PCR, mostrando
350 resultados positivos.

351 No Brasil o teste intradérmico é o método de diagnóstico *ante-mortem* oficial para tuberculose
352 bovina e bubalina. Animais TCC+ são considerados positivos para tuberculose e devem ser abatidos
353 em um período inferior a 30 dias [11], de preferência em um frigorífico oficial no qual amostras de
354 tecido devem ser coletadas para o diagnóstico microbiológico. Neste estudo, a *nested* PCR para TbD1
355 e a cultura detectaram número semelhante de animais positivos no grupo TCC+ ($p = 0,5304$). Não
356 foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre *nested* PCR e cultura dentro do
357 grupo TCC negativos.

358 Durante a inspeção de abate em frigoríficos as principais preocupações são animais que
359 exibem LCT, que são considerados inadequados para o consumo. No entanto nas amostras bovina e
360 bubalina do presente estudo, 37% dos animais TCC+ não apresentaram lesões, dos quais 14,9% eram
361 positivas tanto em cultura como por *nested* PCR. Isto levanta preocupações sobre a transmissão
362 zoonótica de *M. bovis*, pois esta bactéria pode sobreviver ao processo de cozimento [43]. Por esta
363 razão as políticas sanitárias que envolvem testes de PCR com animais TCC+ SLV devem ser
364 consideradas.

365 No Brasil as carcaças que apresentam LCT durante as inspeções sanitárias de rotina são
366 condenados para o consumo. Alguns países que importam carne do Brasil estão exigindo um
367 diagnóstico etiológico dessas lesões. A *nested* PCR foi mais sensível que o cultivo ao detectar *M.*
368 *bovis* em animais que não foram testados pelo TCC, mas apresentavam LCT durante as inspeções
369 sanitárias nos frigoríficos. Uma das possíveis razões para esse resultado é que este grupo incluía 23
370 búfalos da Amazônia (Estado do Amapá), cujos tecidos foram transportados por um longo período em

371 altas temperaturas. Apesar de serem armazenadas em gelo as amostras começaram a deteriorar-se,
372 resultando em culturas negativas, mas as reações de *nested* PCR foram positivas.

373 Várias abordagens têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade de PCR em tempo real
374 quanto à detecção de *Mycobacterium* sp. diretamente de homogeneizados de tecido. Parra et al. [21]
375 utilizando sonda de captura para isolar DNA a partir de homogeneizados de tecidos com
376 micobactérias, conseguiram uma menor sensibilidade (65,6%) do que a encontrada no presente estudo.
377 Taylor et al. [40] relataram sensibilidade de 70%, ao realizarem PCR diretamente sobre
378 homogeneizados de tecidos embora a sensibilidade tenha aumentado para 91% quando incluíram
379 processos de congelamento na fase de extração de DNA. Thacker et al. [34] utilizaram uma estratégia
380 que foi semelhante ao do presente estudo, com PCR convencional seguido por uma reação em tempo
381 real, mas utilizando os alvos IS6110, e detectaram 66,7% das amostras de tecidos bovinos positivas
382 em cultura.

383 Uma das preocupações com o diagnóstico por *nested* PCR, particularmente em relação as
384 reações de PCR em tempo real, é a possibilidade de contaminação cruzada. Durante todo o processo
385 de extração de DNA as luvas foram trocadas com frequência. A extração de DNA foi realizada em
386 capela com nível de biossegurança três, as reações de PCR foram feitas em capela de fluxo laminar
387 com luz UV. Conjuntos separados de micropipetas foram utilizados para extração de DNA e PCR.
388 Ponteiras com filtro foram usadas rotineiramente. Superfícies e equipamentos em contato com
389 microtubos foram limpas antes de cada ensaio. Controles positivos (DNA *M. bovis* AN5) e negativos
390 (sem DNA) foram sempre utilizados.

391 O diagnóstico por *Nested* PCR permitiu a identificação de *M. bovis* em tecidos com um
392 desempenho que foi semelhante ou superior ao obtido por cultura. Os resultados individuais de *nested*
393 PCR foram alcançados em um curto período de tempo (2 dias), em contraste com o resultado de
394 cultura, que levou até 90 dias. Isto sugere que *nested* PCR pode ser usada para o diagnóstico etiológico
395 *post-mortem* de tuberculose bovina e bubalina durante as inspeções de rotina nos frigoríficos. No
396 entanto um estudo em larga escala e uma validação inter-laboratorial são necessários para determinar
397 se o método é adequado para o PNCEBT.

398 Finalmente, houve uma tendência linear positiva confirmando uma relação de dependência

399 entre o aumento de resultados presuntivos em nível negativo (TCC- e NVL) e nível positivo (TCC+ e
 400 LCT), bem como *odds ratio* para resultados positivos em cultura e *nested* PCR. Dependência e análise
 401 de tendências são comumente empregadas em epidemiologia e saúde pública. No presente estudo a
 402 dependência mostrou-se útil para demonstrar a lógica dos resultados laboratoriais com os dados
 403 clínicos dos animais e auxiliar o processo de tomada de decisão em testes de diagnóstico relacionados
 404 com a vigilância sanitária animal e inspeção de alimentos.

405

406 Referências

407

- 408 1. Wells AQ (1937) Tuberculosis in wild voles, Lancet 1, 1221.
- 409 2. Castets, M, Sarrat H (1969) Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum*
 410 (preliminary note). Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr 14: 693-696.
- 411 3. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, et al. (2002) A new evolutionary
 412 scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3684-3689.
- 413 4. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L (2003) Elevation of *Mycobacterium tuberculosis*
 414 subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J
 415 Syst Evol Microbiol 53: 785-1789.
- 416 5. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, et al. (2003) Tuberculosis in seals caused by
 417 a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int
 418 J Syst Evol Microbiol 53: 1305-1334.
- 419 6. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, et al. (2010) Novel
 420 *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis 16: 1296-1299.
- 421 7. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, et al. (2012) Characterization of
 422 *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg Infect Dis 18: 653-655.
- 423 8. Alfredsen S, Saxegaard F (1992) An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by
 424 *Mycobacterium africanum*. Vet Rec 131: 51-53.
- 425 9. Johansen IS, Thomsen VO, Forsgren A, Hansen BF, Lundgren B (2004) Detection of
 426 *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with
 427 necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. J Mol Diagn 6: 231-
 428 236.

- 429 10. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, et al. (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-
430 induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 19: 899-908.
- 431 11. Brasil (2006) Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose –
432 PNCEBT. Manual Técnico, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 190 p.
- 433 12. Brasil (2012) Norma Interna DAS nº02/2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e
434 Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.
- 435 13. Duffield BJ, Norton JH, Hoffmann D (1989) An analysis of recent isolations of *Mycobacterium*
436 *bovis* and saprophytic *mycobacteria* from cattle in northern Queensland. *Aust J Vet* 66: 307-308.
- 437 14. Soini H, Musser JM (2001) Molecular diagnosis of mycobacteria. *ClinChem* 47: 809-814.
- 438 15. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA (1995) Species-specific
439 identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 141: 2131-2138.
- 440 16. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, et al. (2005) Revisiting the evolution of
441 *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 187: 6386-6395.
- 442 17. Lahlou O, Millet J, Chaoui I, Sabouni R, Filali-Maltouf A, et al. (2012) The genotypic population
443 structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance
444 of Euro-American lineages. *Plos One* 7: 47113.
- 445 18. Petroff SA (1915) A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli
446 directly from the sputum and feces. *J Exp Med* 21:38-42.
- 447 19. Ansari-Lari M (2005) Comparison between two tests results, kappa statistic instead of simple
448 overall agreement. *Veterinary Parasitol* 133: 369-370.
- 449 20. Schlesselman JJ (1982) *Case-Control Studies*, Oxford Univ. Press, NY, p. 205.
- 450 21. Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, et al. (2008) Development of a molecular
451 diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*
452 127: 315-324.
- 453 22. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, et al. (2003) The complete genome
454 sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-7882.
- 455 23. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of
456 *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- 457 24. Ameni G, Vordermeier M, Firdessa R, Aseffa A, Hewinson G, et al. (2011) *Mycobacterium*
458 *tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet J* 188: 359-361.
- 459 25. Romero B, Rodríguez S, Bezos J, Díaz R, Copano MF, et al. (2011) Humans as source of
460 *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg Infect Dis* 17: 2393-2395.

- 461 26. Mbugi EV, Katale BZ, Kendall S, Good L, Kibiki GS, et al. (2012) Tuberculosis cross-species
462 transmission in Tanzania: Towards a One-Health concept, Onderstepoort. J Vet Res 79:1-6.
- 463 27. Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC (2012) Detection of *Mycobacterium bovis*
464 and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. Indian J
465 Microbiol 52: 289-291.
- 466 28. Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, et al. (2004) Molecular
467 characteristics of strains of the cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis*
468 in a country with a high prevalence of tuberculosis. J ClinMicrobiol 42: 5029-5035.
- 469 29. Stavrum R, Valvatne H, Bø TH, Jonassen I, Hinds J, et al. (2008) Genomic diversity among
470 Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. Plos One 3: 1973.
- 471 30. Tanveer M, Hasan Z, Siddiqui AR, Ali A, Kanji A, et al. (2008) Genotyping and drug resistance
472 patterns of *M. tuberculosis* strains in Pakistan. BMC Infect Dis 8: 171.
- 473 31. Beyene D, Bergval I, Hailu E, Ashenafi S, Yamuah L, et al. (2009) Identification and genotyping
474 of the etiological agent of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia. J Infect Dev Ctries 3: 412-419.
- 475 32. Banu S, Uddin MK, Islam MR, Zaman K, Ahmed T, et al. (2012) Molecular epidemiology of
476 tuberculosis in rural Matlab. Bangladesh. Int J Tuberc Lung Dis 16: 319-326.
- 477 33. Thomas SK, Iravatham CC, Moni BH, Kumar A, Archana BV, et al. (2011) Modern and ancestral
478 genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* from Andhra Pradesh, India. Plos One 6: 27584.
- 479 34. Thacker TC, Harris, B, Palmer MV, Waters WR (2011) Improved specificity for detection of
480 *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. BMC Vet Res 7:50.
- 481 35. Flynn O, Quigley F, Costello E, O'Grady D, Gogarty A, et al. (2001) Virulence-associated protein
482 characterization of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. Vet Microbiol 78: 221-
483 228
- 484 36. Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, et al. (2009) Molecular characterization
485 of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC
486 Vet Res 5: 4.
- 487 37. Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S (2000) Differentiation among members of the
488 *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two
489 pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. J Clin Microbiol 38: 152-157.
- 490 38. Weber A, Reischl U, Naumann L (1998) Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull
491 from North Bavaria. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 111: 6-8.

- 492 39. Rahim Z, Möllers M, teKoppele-Vije A, de Beer J, Zaman K, et al. (2007) Characterization of
493 *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using
494 spoligotyping. Southeast Asian J Trop Med Public Health 38: 706-713.
- 495 40. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of
496 *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Vet Res
497 3:12.
- 498 41. Costa P, Ferreira AS, Amaro A, Albuquerque T, Botelho, A Couto I, Cunha MV, Viveiros M,
499 Inácio J (2013). Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-
500 nested probe-based real-time PCR. PlosOne 8:e81337.
- 501 42. Barandiaran S, Garbaccio SG, Kiernicki MC, Martinez Vivot, M, Zumarraga MJ (2013)
502 Evaluación de distintas metodologías de extracción de ADN para la detección de *Mycobacterium*
503 *bovis* em tejidos. Rev Argent Microbiol 45: 91.
- 504 43. Van der Merwe M, Bekker JL, van der Merwe P, Michel AL (2009) Cooking and drying as
505 effective mechanisms in limiting the zoonotic effect of *Mycobacterium bovis* in beef. J S Afr Vet
506 Assoc 80: 142-145.